

Die Oxytocinase der Milchdrüse
und ihre Abgrenzung gegenüber
der Oxytocinase des Schwangerenblutes
und verschiedener Gewebe

von

JOHANNA BÄR

1959

Aus dem biochemischen Laboratorium der Chirurgischen
Universitätsklinik in München

Vorstand: Professor Dr. Dr. E. Werle

Die Oxytocinase der Milchdrüse und ihre
Abgrenzung gegenüber der Oxytocinase des
Schwangerenblutes und verschiedener Gewebe.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfasst und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von



Johanna B ä r
aus Buchdorf

1959

5349/60

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Referent: Professor Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Professor Dr. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1959

Für die Stellung des Themas und die stets
freundliche und hilfreiche Unterstützung
bei der Durchführung der Arbeit möchte ich
Herrn Professor Dr. Dr. E. W e r l e auf
diesem Wege meinen aufrichtigen Dank aus-
sprechen.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes
bin ich dem früheren Direktor der Chirur-
gischen Universitätsklinik, Herrn Professor
Dr. E. K. F r e y , zu grossem Dank ver-
pflichtet.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
Einleitung	1
Die Bildungsstätte des Oxytocins	4
Die Chemie des Oxytocins	5
DIE OXYTOCIN ABBAUENDEN FERMENTE	5
Die O x y t o c i n a s e der M i l c h d r ü s e	6
Methodik der Bestimmung der Oxytocinase-Aktivität	6
I	
Vergleich der Oxytocinase der Milchdrüse der Kuh mit der Oxytocinase des Schwangerenserums.	8
1) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase durch Aethylendiamintetraacetat	9
2) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase durch 8-Oxychinolin	12
3) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase durch p-Cl-Mercuribenzoesäure	13
4) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase durch Cystin	16
5) Zur Frage der Beeinflussung der Kuheuteroxytocinase durch KCN	18
6) Zur Frage der Beeinflussung der Kuheuteroxytocinase durch Sojabohneninhibitor und Ovomucoid	19
7) Aktivitäts - pH - Optimum der Kuheuteroxytocinase	19
8) Fraktionierung des Kuheuterextraktes mit Ammonsulfat	20
9) Herstellung eines Trockenpulvers aus Kuheuter-Extrakt mit Aceton	22
II	
1.) Versuche mit Extrakten aus der Milchdrüse eines weiblichen Kalbes	24
2.) Zur Frage der Oxytocinase-Aktivität von Rinderkolostrum	26
3.) Versuche mit Fettgewebe	26

	Seite
4.) Versuche mit Ziegeneuterextrakt	27
5.) Eiweissbestimmung des Kuh- und Ziegeneuter- Extraktes	29
6.) Versuche mit synthetischem Oxytocin	30

III

Abgrenzung der Oxytocinase der Milchdrüse gegenüber anderen Gewebs-Oxytocinasen	31
1) Die Oxytocinase der Plazenta	32
2) Die Oxytocinase des Darmes	34
3) Die Oxytocinase des Pankreas	36
 Zusammenfassung und Diskussion	 39
Literaturverzeichnis	43
Lebenslauf	45

E I N L E I T U N G

Über die Faktoren, die den Geburtsmechanismus auslösen sollen, wurden in der Humanmedizin verschiedene Theorien aufgestellt. Während in früherer Zeit der Geburtsvorgang für ein rein mechanisch-physikalisches Geschehen gehalten wurde, schrieben ihm Kellmann (1890) und Keiffer auch eine nervös-reflektorische Komponente zu. (Druck des Kopfes auf den Frankenhäuser'schen Ganglienzellplexus bzw. Druck auf die Amphora Körperchen im Bereich des inneren Muttermundes).

Auch umweltbedingte Einflüsse - vor allem Witterungsvorgänge - wurden von verschiedenen Autoren als wehenauslösend beschrieben.

Seit der Jahrhundertwende wird der Wirkung der Inkrete von bestimmten Drüsen und einiger Gewebshormone, sog. local hormones, eine Funktion bei der Wehenauslösung und Erzeugung zugeschrieben. So glaubt man in den Stoffen Histamin, Acetylcholin und Adrenalin, in uterusaktiven Gewebsextrakten aus Plazenta, Schilddrüse und vor allem aus dem Hypophysenhinterlappen (H.H.L.) - dessen Uteruswirksamkeit Dale 1906 beobachtet hatte - den Geburtsvorgang beeinflussende Faktoren sehen zu können. (1)

Nach Untersuchungen von H. Knaus soll der Uterus durch das Nachlassen der Corpus-luteum-Hormonproduktion in der Plazenta durch das Follikelhormon kontraktionserregbar und somit empfänglich für das HHL - Hormon Oxytocin werden.

Nach Tapfer beruht der Geburtsbeginn auf dem Verschwinden von wehenhemmenden und der Zunahme von wehenfördernden hormonalen Substanzen. Auf welchem Wege dann die hormonalen Reize die autonome Nervenregelung der Wehentätigkeit in Gang setzen, ist noch nicht geklärt. (2)

Besonders merkwürdig erscheint in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass im Blut der Schwangeren - auch unter der Geburt - ein sehr aktives Ferment kfeist, das das uteruserregende Hormon des HHL., das Oxytocin, rasch zu inaktivieren vermag.

Von Fekete wurde 1930 erstmals festgestellt, dass das Blut schwangerer Frauen die Fähigkeit besitzt, Oxytocin zu inaktivieren. Von E. Werle und G. Effkemann (3) wurde diese Tatsache bestätigt und eingehender mit folgendem Ergebnis untersucht:

Das oxytocinabbauende Prinzip tritt kurze Zeit nach Beginn der Schwangerschaft im mütterlichen Blut auf, geht aber nicht in das Fetalblut über und ist auch nicht im Harn nachweisbar. Seine Aktivität nimmt mit fortschreitender Schwangerschaft zu und besitzt unter der Geburt den höchsten Wert. Erst in der 3. - 4. Woche nach der Geburt verschwindet es aus dem Blut und ist im Normalblut nicht mehr anzutreffen.

Das oxytocinabbauende Ferment dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach die Aufgabe haben, den Uterus in der Schwangerschaft vor der wehenauslösenden Wirkung des HHL-Hormons zu schützen. Da unter der Geburt der Uterus äusserst empfindlich gegenüber Oxytocin ist, aber selbst die gesunde Uterusmuskulatur vor zu gewaltigen Kontraktionen geschützt werden muss, ist es wohl einleuchtend, dass zu diesem Zeitpunkt der grösste Fermentspiegel an Oxytocinase im Blut erforderlich ist. Schon eine geringe Oxytocin - Oxytocinaseverschiebung kann zu diesem Zeitpunkt eine geburtseleitende Situation herbeiführen. (1)

Auf Grund der Tatsache, dass während der Schwangerschaft der Oxytocinasespiegel im Blut kontinuierlich ansteigt, wurde von Page, E. Werle und Mitarbeitern (4 u. 5) eine Methode zur Schwangerschafts-Diagnose mit Bestimmung des Alters der Frucht ausgearbeitet, die sich auf den qualitativen und quantitativen Oxytocinase-Nachweis im Serum gründet.

In neuesten Untersuchungen gelang es Semm (1) experimentell als Bildungsort der schwangerschaftsspezifischen Serum-Oxytocinase den syncytialen Trophoblasten der Plazenta nachzuweisen. Zuvor wurde bereits von E. Werle und Mitarbeitern, sowie von Page, die Bildungsstätte der Oxytocinase im Trophoblasten vermutet.

Während sich im Serum von Männern und nichtschwangeren Frauen selbst keine Oxytocinase nachweisen liess, konnte dieses Serum durch Zusatz von Glutathion oder Cystein zum Oxytocinabbau befähigt werden. (6) Page stellte in den Erythrocyten von Männern, Frauen, Schwangeren und Gebärenden ebenfalls ein Ferment fest,

das Oxytocin zu inaktivieren imstande ist. Von E. Werle und Mitarbeitern (7 u. 8) konnte nachgewiesen werden, dass dieses Ferment von der in der Schwangerschaft im Blut auftretenden Oxytocinase verschieden ist.

Im Blutserum trächtiger Tiere, z.B. bei Pferden, Kühen, Schweinen, Hunden, Katzen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen, fehlt die Oxytocinase. Sie ist aber in den Erythrocyten dieser Tiere nachweisbar, wobei kein Unterschied zwischen der Erythrocyten - Oxytocinase - Aktivität trächtiger und nichtträchtiger Tiere besteht. (4 u. 6)

Nach Untersuchungen von E. Werle und Mitarbeitern (9) konnte weder im Blutserum trächtiger, noch nichtträchtiger Kühe Oxytocinase-Aktivität nachgewiesen werden. Im Erythrocytenhämolysat (nicht aber bei intakten Erythrocyten) sowohl trächtiger als auch nichtträchtiger Kühe wurde jedoch eindeutig ein oxytocinabbauendes Ferment festgestellt.

Man kann also annehmen, dass bei Kühen (und allen anderen Säugetieren) eine spezifische Schwangerenserum-Oxytocinase als Uterusschutzfaktor nicht vorkommt. Er findet sich offenbar nur bei Primaten erster Ordnung. (1)

Nach Erfahrungen der Veterinärmedizin ist bekannt, dass Pituitin (Oxytocin) auf die Milchejektion eine anregende Wirkung ausübt. Auch für den Menschen trifft dies zu. (15). Ely und Petersen erklärten die Wirkungsweise des Oxytocins aus seiner Fähigkeit, die Kontraktion der glatten Muskulatur anzuregen. Der Anreiz zur Oxytocin-Ausschüttung erfolge durch die Palpation der Zitze beim Saug- oder Melkakt. Die Autoren machen hierbei das Oxytocin verantwortlich für die starke Zunahme des intraglandulären Druckes, der die Milch aus den Alveolen und Ductuli herauspresst.

Ein höherer Milchertrag auf die Dauer gesehen liess sich jedoch durch Pitocin nicht erzielen. Wohl aber konnte durch Pitocin die sog. Restmilch gewonnen werden, die durch die übliche Melkmethode dem Euter nicht zu entziehen ist. Der Milchertrag bei der darauffolgenden Melkung war um den Restmilchertrag geringer. (9) Tschechische Autoren (10) hingegen berichten, dass die geringste Oxytocindosis, die bei intravenöser Verabreichung an Milchkühen deren Milchabsonderung zu erhöhen vermochte 0,05 I.M.E. beträgt. Ausserdem bestehe eine deutliche quantitative Beziehung zwischen

injizierter Oxytocinmenge und ejektierter Milchmenge.

G.K. Benson und S.J. Folley wiesen nach (11), dass durch Gaben von Oxytocin die Rückbildung der Milchdrüsen säugender Ratten nach Absetzung der Jungen 9 Tage lang hinausgeschoben werden konnte. (Einen geringen Einfluss hatte auch Vasopressin). Diese Wirkung trat jedoch nicht ein, wenn zuvor die Hypophyse entfernt wurde. Der gleiche Effekt zeigte sich auch bei Gaben von Prolaktin, weniger nach Verabreichung des somatotropen Hormons. Die Autoren schliessen daraus, dass Oxytocin eine Rolle bei der Freisetzung von Prolaktin und anderen laktotropen und galaktotropen Hormonen aus dem HVL eine Rolle spielen dürfte.

Die Bildungsstätte des Oxytocins.

Allgemein werden Oxytocin und Vasopressin als die HHL-Hormone bezeichnet. Beide wirken auf die Milchejektion fördernd; (bei den Vögeln vasodepressorisch); wehenanregend auf den Uterus; anti-diuretisch und pressorisch; jedoch entsprechen die ersten drei Wirkungen hauptsächlich dem Oxytocin, die letzteren zwei dem Vasopressin (12).

Nach den Forschungsergebnissen der letzten 20 Jahre soll jedoch der HHL seinen Namen als Hormonbildner zu Unrecht tragen. Als Bildungsstätte der oben angeführten Hormone sei die Gegend des Hypothalamus anzusehen. Der Neurohypophyse wird nur mehr die Aufgabe der Stapelung und Ausscheidung der Hormone zugeschrieben.

Die Frage, ob Oxytocin und Vasopressin im menschlichen Organismus getrennt gebildet werden oder stets als Einheit in einem Gesamtproteid (Hypophysin) im Hypothalamus entstehen und dann im HHL gestapelt und ausgeschieden werden, ist noch nicht geklärt (13). Im letzteren Fall käme der Neurohypophyse noch eine weitere Aufgabe zu, nämlich die der Aufspaltung des Makromoleküls, wofür Semm den Ausdruck "Transformation" gebraucht (1).

Nach neuesten Untersuchungen ist jedoch eine unitarische Substanz abzulehnen. (14)

Die Chemie des Oxytocins

1919 teilte Dudley mit, dass die oxytocische und vasopressorische Wirkung des HHL - Extraktes auf 2 chemisch differente Stoffe zurückzuführen sei.

Durch dauernde Verbesserungen der Verfahren gelang es verschiedenen Forschern u.a. Tuppy, Pierce und Du Vigneaud beide Stoffe voneinander zu trennen und anzureichern. Bald war es möglich die Summenformel und das Molekulargewicht und später auch die Struktur des Oxytocins anzugeben. Auch die Struktur des Vasopressins wurde aufgeklärt. Das Oxytocin ist demnach ein Oktapeptid, bestehend aus einem zyklischen Pentapeptid (Cystin, Tyrosin, Isoleucin, Glutamin und Asparagin) und einem linearen Tripeptid (Prolin, Leucin und Glycinamid). Es unterscheidet sich vom Vasopressin dadurch, dass es Phenylalanin an Stelle von Isoleucin und Arginin (beim Rind) bzw. Lysin (beim Schwein) an Stelle von Leucin enthält.

Oxytocin: C₄₃ H₆₆ O₁₁ N₁₂ S₂ MG 991,2

CyS.Tyr.Ileu.Glu(NH₂).Asp(NH₂).CyS.Pro.Leu.Glyc(NH₂)

Vasopressin: C₄₆ H₆₅ O₁₂ N₁₅ S₂ MG 1084,22
(Rind)

CyS.Tyr.Phe.Glu(NH₂).Asp(NH₂).CyS.Pro.Arg.Glyc(NH₂)

DIE OXYTOCIN ABBAUENDEN FERMENTE.

Da die Erfolgsorgane pharmakologisch aktiver körpereigener Substanzen vielfach Fermente enthalten, welche diese Substanzen abbauen können, untersuchten E. Werle und Mitarbeiter (15) am Beispiel des Kuheuters, ob laktierende Milchdrüsen Oxytocin zu inaktivieren vermögen. Es zeigte sich, dass ein Extrakt aus Kuheuterdrüsengewebe in der Tat oxytocinaseaktiv ist.

Auch in Extrakten aus anderen Organen wie Pankreas und Ovar des Schweines u.a. (16) wurde Oxytocinase-Aktivität festgestellt.

Die weitere Forschung gilt daher der Klärung der chemischen Natur der Oxytocin abbauenden Fermente bzw. der Feststellung der Spezi-

fität der Oxytocinasen.

Von Tuppy und Nesvadba (17) wurde im menschlichen Blutserum ein Enzym gefunden, das die Eigenschaft besitzt, chromogene Amino-peptidasesubstrate zu hydrolysieren. Die Spaltung erfolgte durch Schwangerenserum etwa 13 - 23 mal schneller als durch Normalserum. Eine Identität dieses Enzyms mit der Schwangerenserum-Oxytocinase glauben die Autoren jedoch auf Grund des mehrfach verschiedenen chemischen Verhaltens beider Fermente verneinen zu können.

Im folgenden wird versucht, die Milchdrüsenoxytocinase gegen die Oxytocinase des Schwangerenserums und der Gewebe gegeneinander abzugrenzen.

Die Oxytocinase der Milchdrüse

Eigene Untersuchungen.

Methodik der Bestimmung der Oxytocinase-Aktivität:

Bisher ist es nicht möglich die Oxytocinase-Aktivität anders als durch Verfolgung des Oxytocinabbaus mit Hilfe des isolierten Rattenuterus zu bestimmen. Die Untersuchung wurde daher an Hand der indirekten Methode von Page, E. Werle und K. Semm (4) ausgeführt.

Versuchsmaterial:

Schlachtfisches Kuheuter wurde von Fett und Kapsel befreit und bei -15°C eingefroren. Dabei bleibt die Oxytocinase-Aktivität wochenlang unverändert erhalten, während sie bei Zimmertemperatur innerhalb von 24 Stunden restlos verloren geht. (15)

Stücke dieses eingefrorenen Drüsengewebes wurden für die Untersuchungen mit Aqua dest. jeweils im Verhältnis 1:4 homogenisiert und anschliessend etwa 20 Minuten lang zentrifugiert. Das so gewonnene milchig-trübe Zentrifugat wurde unverdünnt für alle angeführten Versuche verwendet.

Als Oxytocinlösung wurde das Oxytocinpräparat der Firma Hormon-Chemie München verwendet. Es enthält 3 IE pro ml.

Vorgang der Testung am isolierten Rattenuterus:

Die Austestungen wurden am isolierten Rattenuterus durchgeführt, der zwar nicht so empfindlich ist wie der Meerschweinchenuterus,

dafür aber wesentlich rascher und konstanter auf Oxytocin reagiert als dieser.

Ausgewachsenen, nicht trächtigen, durch Nackenschlag getöteten Ratten wurde der Uterus entnommen und dieser sofort in Tyrodelösung gelegt. Nach etwa 1 - 2 Stunden wurde der vaginale Teil eines Uterushornes im Tyrodebad von 37° C aufgehängt. Nach einer weiteren Stunde konnten die Messungen beginnen.

Vor der eigentlichen Austestung der Ansätze musste jedesmal in einem Vortest die Empfindlichkeit des Uterus festgestellt werden, da die Ansprechbarkeit der Rattenuteri auf die gleiche Menge Oxytocin von Tier zu Tier grossen Schwankungen unterliegt.

Zusammensetzung der Ansatzlösungen:

1,9 ml Kuheuterextrakt (KEE)

0,1 ml Oxytocin = 0,3 int. Einheiten (IE)

0,2 ml Aqua dest. (bzw. verschiedene Lösungen)

Als Standardlösung für den Vortest und als Vergleichstest für den bereits erfolgten Oxytocinabbau wurde an Stelle von Kuheuterextrakt Aqua dest. verwendet. Als eine weitere Vergleichslösung diente der sogenannte "Nullansatz", eine Lösung von der gleichen Zusammensetzung wie der zu bestimmende Ansatz. Die Oxytocinmenge wurde jedoch erst unmittelbar vor Applikation der Lösung in das Tyrodebad (in dem sich das isolierte Rattenuterushorn befand) zugesetzt. Die Oxytocin-Standardlösung und der Nullansatz unterschieden sich im Kurvenbild voneinander nicht.

Die oben angeführte Zusammensetzung der Ansatzlösungen wurde, abgesehen von einigen kleinen unwesentlichen Änderungen (die eigens angeführt sind) in allen Versuchen beibehalten. Die Menge dieser Lösung aber, die bei Injektion in das Tyrodebad den Uterus zu einer messbaren und gut auswertbaren Kontraktion veranlasste, musste an jedem neuen Uterushorn in dem bereits erwähnten Vortest bestimmt werden und lag bei 0,1 - 0,5 ml, wobei 1 ml 0,136 IE Oxytocin enthielt.

Die Kontraktionen des Uterus wurden über einen Schreibhebel auf eine rotierende berusste Trommel übertragen und so aufgezeichnet. Nach jeder erfolgten Kontraktion wurde das Tyrodebad zwei- bis dreimal erneuert und eine Ruhepause von mindestens 3 Minuten vor

jeder weiteren "Injektion" eingeschaltet. Letztere konnte ausserdem nur dann erfolgen, wenn der Schreibhebel seine Ausgangslage wieder eingenommen hatte.

Um den Oxytocinabbau zu beschleunigen und um gleiche Temperaturverhältnisse zu gewährleisten wurden die Ansätze in ein Wasserbad von 37°C gebracht, da bei Zimmertemperatur der Abbau wesentlich langsamer vonstatten geht. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer (15 - 60 Min.) wurde die Reaktion durch Abkühlung auf 0°C unterbrochen und die bereits abgebaute Oxytocinmenge am Rattenuterus getestet.

War die Kontraktionshöhe und Dauer nach Gabe eines aliquoten Teils des Hauptansatzes halb so gross wie nach Gabe des gleichen Anteils des Nullansatzes (bzw. der Standard-Oxytocinlösung), so wurde dies als 50%-iger Abbau des Oxytocins gewertet; sprach der Uterus auf den Hauptansatz nicht mehr an als 100%-iger Abbau.

I

Vergleich der Oxytocinase der Milchdrüse der Kuh mit der Oxytocinase des Schwangerenserums.

Auf Grund der Untersuchungen von E. Werle und Mitarbeitern (6) ist folgendes bekannt:

Die Inaktivierung des Oxytocins ist eine Zeitreaktion. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Temperatur stark zu und ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig (Optimum zwischen pH 6,5 und 7,5).

Bei konstanter Oxytocinasemenge aber steigender Hormonkonzentration wird in der Zeiteinheit immer etwa derselbe Bruchteil der vorhandenen Oxytocinmenge abgebaut.

Das Schwangerenserum behält, steril bei 10°C aufbewahrt, monatelang seine Oxytocinase-Aktivität bei. Die Oxytocinase ist thermolabil und verliert beim Kochen ihre Aktivität. Erwärmen auf 57°C schädigt sie nur langsam. Nach dreistündigem Erwärmen auf 57°C sind erst etwa 30% des Fermentes zerstört. Trocknen des Schwangerenserums mit Aceton und Äther zerstört die Aktivität, sie kann jedoch durch Cystein oder Glutathion wieder hergestellt werden.

Für die Kuheuteroxytocinase fanden E. Werle und Mitarbeiter (15) folgendes:

Frisch exstirpierte Kuheuter behalten bei -20°C aufbewahrt wochenlang ihre Oxytocinase-Aktivität fast unverändert, während diese bei $4 - 8^{\circ}\text{C}$ innerhalb 24 Stunden etwa zu 90% verloren geht. Der wässrige Extrakt wird innerhalb von 24 Stunden bei Aufbewahrung bei -20°C vollkommen inaktiv. Bei Zimmertemperatur tritt die Inaktivierung schon wesentlich früher ein. Kurzes Aufkochen oder einstündiges Erwärmen auf 56°C inaktiviert den Extrakt. Trocknen des Extraktes mit Aceton und Äther zerstört die Aktivität, ist jedoch durch Cystein oder Glutathion wieder herstellbar. (Vasopressinase, die ebenfalls im Kuheuterextrakt enthalten ist, bleibt gegenüber diesen genannten Einwirkungen unempfindlich, ist daher von der Kuheuteroxytocinase verschieden).

Der Zusatz von Cystein und Glutathion zu aktiven Euterextrakten (5mg/ml) erhöht die Oxytocinase-Aktivität um mehrere 100%.

Nach E. Werle und Mitarbeiter (16) ist die Schwangerenserum-Oxytocinase eine Peptidase. Peptidasen sind aber nach E.L. Smith spezifische Proteine, die meist nur in Verbindung mit zweiwertigen Metallen wirksam sind.

E. Werle und Mitarbeiter (16) stellten fest, dass Schwangerenserum nach Zugabe von Metallkomplexbildnern, wie Aethylendiamintetraacetat und 8-Oxychinolin, seine Fähigkeit, Oxytocin abzubauen, nahezu vollkommen verliert.

Es lag nun nahe festzustellen, ob die Kuheuteroxytocinase sich gegenüber diesen Metallkomplexbildnern wie die Serumoxytocinase verhält.

1.) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase durch Aethylendiamintetraacetat.

Verwendet wurde das leicht lösliche Natriumsalz, Dinatrium-Dihydrogen-Aethylendiamintetraacetat, der Fa. Riedel de Haen, (Idranal) und das der Anilin- u. Sodafabrik AG., Ludwigshafen (Trilon B).

Durchführung der Versuche mit Kuheuterextrakt:

Kuheuterextrakt wurde sowohl mit Idranal (0,336 mg/ml Extrakt = 0,001 molar) wie auch ohne Idranal 15 Minuten lang im Wasserbad von 37°C vorinkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde zu beiden Ansätzen Oxytocin (0,136 IE/ml) hinzugefügt. Nach weiteren 60 Minuten erfolgte die Testung am Rattenuterus.

Sie ergab:

In beiden Ansätzen war das Oxytocin etwa zu 75% abgebaut.

Siehe auch Abbildung I Pfeil 2, 5 u. 6

Weitere Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 1

Idranal Konz.molar	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub.Zt. in Min.	Abbau in %	
			ohne	/ mit Hemmstoff
1.) 0,001	15	30	40	40
		50	50	50
		90	60	60
		110	65	62
		130	70	70
2.) 0,001	15	30	30	30
		60	75	75
3.) 0,01	15	80	60	63
4.) 0,01	15	25	80	80
		60	100	100
5.) 0,01	15	90	90	90
6.) 0,01	30	60	100	100
7.) 0,01	30	30	kein Unterschied	
		65	% schlecht angebar	

Ergebnis:

Aethylendiamintetraacetat hemmt die Kuheuteroxytocinase (im Gegensatz zur Schwangerenserumoxytocinase) in keinem der angeführten Versuche.

Selbst hohe Dosen an Idranal (3,36 mg/ml = 0,01 molar) waren ohne Wirkung.

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit der Kuheuteroxytocinase mit der Schwangerenserumoxytocinase wurde die Hemmung durch Trilon B (Idranal) auch am Schwangerenserum durchgeführt.

Durchführung der Versuche mit Schwangerenserum:

Schwangerenserum Mens X wurde bei Zimmertemperatur mit Trilon B versetzt (3,36 mg/ml = 0,01 molar). Nach viertelstündiger Vorinkubation wurde zu diesem Ansatz wie auch zu einem weiteren Ansatz ohne Trilon B Oxytocin hinzugefügt (0,136 IE pro ml). Nun wurden diese Ansätze in das Wasserbad von 37° C gestellt. Nach 90 Minuten wurde die Reaktion durch Abkühlung auf 0 °C unterbrochen. Die Testung am Rattenuterus ergab, dass das Oxytocin des Ansatzes ohne Trilon B bis auf einen geringen Rest (etwa 25%) abgebaut war, während im Ansatz mit Trilon B das Oxytocin weitgehend erhalten geblieben war (etwa nur 10 - 15%-iger Oxytocin-Abbau).

Zwei weitere Versuche zeigten folgendes Ergebnis:

Tabelle 2

Idranal/ Konzentr.	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in %	
		ohne	/- mit Hemmstoff
0,01 m (Mens VIII)	50	70	10
1 mg/ml (Mens VII)	50	60	0

Ergebnis:

Aethylendiamintetraacetat hemmt die Oxytocinase des Schwangerenserums, wie bereits von E. Werle und Mitarbeiter (16) beschrieben wurde.

2.) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase
durch 8-Oxychinolin

Verwendet wurde das 8-Oxychinolin der Fa. Merck.

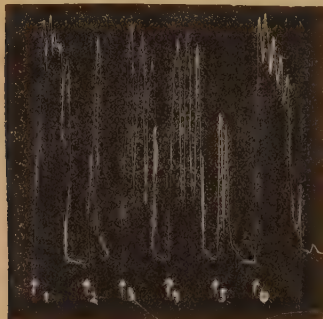


Abb. I

Abbau von Oxytocin durch KEE
allein und in Gegenwart von
8-Oxychinolin und Trilon B.

Versuch zu Abbildung I:

In die etwa 10 ml luftdurchperlter Tyrodelösung von 37° C, in der das isolierte Rattenuterushorn suspendiert war, wurden injiziert:

bei 1) 0,1 ml der Standard-Oxytocinlösung = 0,0136 IE Oxytocin

bei 2) 0,1 ml KEE (15 Min. bei 37° C vorinkubiert)
+ 0,0136 IE Oxytocin, nun weitere 60 Min. bei 37°
inkubiert.

Oxytocinabbau 75%

bei 3) 0,1 ml KEE + 8-Oxychinolin/ 0,01 molar

15 Min. bei 37° C vorinkubiert

+ 0,0136 IE Oxytocin, 60 Min. bei 37° C inkubiert
Oxytocinabbau 0%

bei 4) wie bei 3 nur ohne Inkubationszeit = "Nullansatz"

bei 5) 0,1 ml KEE + Trilon B/ 0,001 molar

15 Min. bei 37° C vorinkubiert

+ 0,0136 IE Oxytocin, 60 Min. bei 37° C inkubiert
Oxytocinabbau 75%

bei 6) wie bei 5 nur ohne Inkubationszeit = "Nullansatz"

Weitere Versuche sind aus folgender Tabelle zu ersehen:

Tabelle 3

8-Oxychinolin Konzentr.	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub.Zt. in Min.	Abbau in % ohne/ mit Hemmst.	
1) 0,001 molar	15	50	90	80
2) 0,01 "	15	30	30	0
		60	75	0
3) 0,5 mg/ml	15	30	85	50
4) 1,0 mg/ml	30	45	50	5
5) 1,0 mg/ml	0	45	50	50
6) 1,0 mg/ml	0	40	90	90
7) 1,0 mg/ml	0	40	90	90

Ergebnis:

8-Oxychinolin hemmt die Kuheuteroxytocinase (wie auch die Schwangerserum-Oxytocinase (16)).

0,5 mg/ml Extrakt = 0,0034 molar erreichten gerade noch 50%-ige Hemmung des Oxytocinasabbaus. Eine 0,001 molare Lösung hatte nur noch geringe Hemmwirkung. Ohne Vorinkubation trat keine Hemmung ein.

Als weitere mögliche Hemmstoffe wurden noch p- Cl-Mercuribenzoessäure und Cystin geprüft.

3.) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase
durch p-Cl-Mercuribenzoessäure

Verwendet wurde die p-Cl-Mercuribenzoessäure der Fluka AG., chem. Fabrik, Buchs/Sb. (abgekürzt p-Cl-MBS)

Versuchsvorgang:

Einige ml Kuheuterextrakt wurden 30 Minuten lang mit p-Cl-MBS (0,001 molar) im Wasserbad von 37° C inkubiert und anschliessend mit Oxytocin (0,136 IE/ml) versetzt und weitere 90 Min. im Wasserbad belassen.

Die Testung am isolierten Rattenuterus ergab 20%-igen Oxytocinabbau gegenüber 90%-igem Oxytocinabbau im Ansatz ohne p-Cl-MBS. Siehe auch Abbildung III, Pfeil 1 u. 4

Weitere Versuche fasst folgende Tabelle zusammen:

Tabelle 4

p-Cl-MBS Konz./molar	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in %	
			ohne	mit Hemmstoff
1) 0,01	30	50	75	0
2) 0,001	15	20	75	0
3) 0,001	15	60	100	10
4) 0,001	30	90	90	20
5) 0,001	30	75	55	0
		100	90	25
6) 0,001	60	45	90	25
7) 0,001	20	45	50	0
		60	80	0
8) 0,001	0	45	50	0
		60	80	0
9) 0,001	0	20	50	0
10) 0,0005	20	45	50	0
		60	80	0
11) 0,0005	30	20	50	0
12) 0,0005	0	20	50	20
13) 0,0002	30	20	50	40
		35	75	40
14) 0,0002	0	20	50	40
		35	75	40
15) 0,0001	30	60	95	95

Ergebnis:

p-Cl-Mercuribenzoessäure hemmt den Abbau des Oxytocins durch die Kuheuteroxytocinase, wobei eine 0,0002 m Lösung gerade noch eine 50 - 60%-ige Hemmung herbeiführt und zwar sowohl mit als auch ohne Vorinkubation. Eine längere Vorinkubationszeit hat nur einen geringen verstärkenden Einfluss auf die Hemmwirkung. Die Hemmung durch p-Cl-MBS tritt also augenblicklich ein.

Eine 0,001 m Lösung bewirkt 100%-ige Hemmung der Oxytocinase, eine 0,0001 m Lösung besitzt keine Hemmfähigkeit mehr.

Vergleich mit der Schwangerenserumoxytocinase:



Abb. II

Abbau von Oxytocin durch Retroplazentarserum allein und in Gegenwart von p-Cl-Mercuribenzoessäure.

Zu Abbildung II:

In die etwa 10 ml luftdurchperlter Tyrodelösung von 37° C, in der das isolierte Rattenuterushorn suspendiert war, wurden injiziert:

bei 1) 0,2 ml Standard-Oxytocinlösung = 0,0272 IE Oxytocin

bei 2) 0,2 ml Retroplazentarserum (15 Min. bei 37° C vorinkub.)
+ 0,0272 IE Oxytocin, nun weitere 60 Min. bei 37°
inkubiert.

Oxytocinabbau 75%

bei 3) 0,2 ml Retroplazentarserum + p-Cl-MBS/ 0,001 molar
15 Min. bei 37° C vorinkubiert
+ 0,0272 IE Oxytocin, nun weitere 60 Min. bei 37°
inkubiert.

Oxytocinabbau 5%

Weitere Versuche in

Tabelle 5

p-Cl-MBS Konz./molar	Vorinkub. in Min.	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in %	
			ohne	/ mit Hemmstoff
1) 0,001	15	45	70	0 (Schw.S.)
2) 0,001	15	60	50	20 (" ")
3) 0,001	15	60	75	5 (Retropl. Serum)

Ergebnis:

p-Cl-Mercuribenzoessäure hemmt die Schwangerenserumoxytocinase ebenso wie die Kuheuteroxytocinase.

4.) Zur Frage der Hemmbarkeit der Kuheuteroxytocinase durch Cystin.

Verwendet wurde das Cystin von F. Hoffmann - La Roche & Co., AG. Berlin.

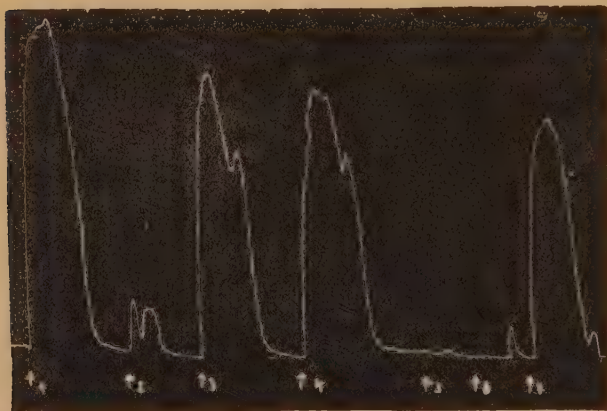


Abb. III

Abbau von Oxytocin durch KEE allein und in Anwesenheit von Cystin, Cystein u. p-Cl-Mercuribenzoessäure.

Versuchsbeschreibung zu Abbildung III:

Zu dem suspendierten isolierten Rattenuterushorn wurden in die Tyrodelösung injiziert:

bei 1) 0,1 ml Standard-Oxytocinlösung = 0,0136 IE Oxytocin

bei 2) 0,1 ml KEE (30 Min. bei 37° C vorinkubiert)

+ 0,0136 IE Oxytocin, noch weitere 90 Min. bei 37° inkubiert.

Oxytocinabbau 90%

bei 3) 0,1 ml KEE + Cystin/ 0,001 molar, 30 Min. vorinkubiert

+ 0,0136 IE Oxytocin, 90 Min. inkubiert

Oxytocinabbau 20%

bei 4) 0,1 ml KEE + p-Cl-MBS/ 0,001 molar, 30 Min. vorinkubiert

+ 0,0136 IE Oxytocin, weitere 90 Min. inkubiert

Oxytocinabbau 20%

- bei 5) 0,1 ml KEE + Cystin/ 0,001 molar, 30 Min. vorinkubiert
+ 0,0136 IE Oxytocin + Cystein (1,5 mg/ml $\approx$ 0,01 m)
65 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 100%
- bei 6) 0,1 ml KEE + p-Cl-MBS/ 0,001 molar, 30 Min. vorinkubiert
+ 0,0136 IE Oxytocin + Cystein ($\approx$ 0,01 molar)
60 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 100%
- bei 7) Im Anschluss an die Testung 4) wurden zu dem "Ansatz"
noch 5 mg/ml Cystein hinzugefügt und dieser weitere
60 Min. im Wasserbad von 37° C belassen.
Zusätzlicher Oxytocinabbau 10%.

Nähere Erläuterungen zu 5) - 7):

Dem Kuheuterextrakt wurde für die Testung 5) u. 6) gleichzeitig mit dem Oxytocin 1,5 mg Cystein/ ml KEE $\approx$ 0,01 molar zugesetzt, während die Hemmstoffe (p-Cl-MBS und Cystin) 30 Min. vorher inkubiert wurden.

Die sonst sicher eingetretene Hemmung der Oxytocinase wurde durch die Cysteinwirkung aufgehoben, (100%-iger Oxytocinabbau) da Cystein die Oxytocinase erheblich zu aktivieren vermag (15). Im Anschluss an die unter 4) angeführte Testung wurden zu dem Ansatz mit p-Cl-Mercuribenzoessäure (bereits vorhandene 80%-ige Oxytocinasehemmung) 5 mg/ml Cystein hinzugefügt. Nach weiterer Inkubation von einer Stunde waren zusätzlich nur noch etwa 10% Oxytocin abgebaut. Die Hemmung war also durch Cystein im Nachhinein nicht aufhebbar.

Tabelle 6

Cystin Konz./molar	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub.Zt. in Min.	Abbau in %	
			ohne	mit Hemmstoff
1) 0,001	30	90	90	20
2) 0,001	30	100	90	5
3) 0,001	60	45	80	50
4) 0,0001	30	60	95	95

Ergebnis:

Cystin hemmt die Kuheuteroxytocinase unter den gleichen Bedingungen und mit dem gleichen Ergebnis wie p-Cl-Mercuribenzoessäure.

Vergleich mit der Schwangerenserumoxytocinase.Versuchsvorgang:

Einige ml Schwangerenserum wurden 15 Min. lang mit Cystin (0,001 m) inkubiert (im Wasserbad von 37° C). Ebenso einige ml Schwangerenserum ohne Cystin. Anschliessend wurde zu beiden Ansätzen Oxytocin (0,136 IE/ml) hinzugefügt und weitere 90 Min. im Wasserbad von 37° C belassen.

Die Testung am isolierten Rattenuterus ergab in beiden Fällen 80%-igen Oxytocinabbau.

Ergebnis:

bei der Schwangerenserumoxytocinase ist Cystin auf die Aktivität ohne Einfluss. (Das gleiche Ergebnis berichtet auch K. Semm (1)).

5.) Zur Frage der Beeinflussung der Kuheuter-
Oxytocinase durch KCN.

Die Ansätze waren in Bezug auf KCN: 0,02; 0,01 u. 0,001 molar. Die einzelnen Testungen erfolgten nach einer Vorinkubationszeit von 10 Min. (bzw. auch ohne Vorinkubation) und anschliessender Inkubationszeit von 10; 15; 20; 30; 40 u. 45 Min. Verglichen mit dem Nullansatz, der Oxytocinstandardlösung und dem Ansatz ohne KCN ergab sich nie ein Unterschied im Oxytocinabbau. Auch eine Beeinflussung des Oxytocins durch KCN in einer Oxytocinstandardlösung wurde nicht beobachtet.

Ergebnis:

In keinem Versuch zeigte sich eine Beeinflussung der Kuheuter-Oxytocinase, weder im Sinne einer Aktivierung noch einer Hemmung. KCN setzte jedoch die Ansprechbarkeit des Rattenuterus auf Oxytocin stark herab, so dass eine exakte Auswertung der Ergebnisse unmöglich war.

Die kleinste "injizierte" KCN-Dosis betrug 12,8 μ g, die höchste 640 μ g.

Auch auf die Schwangerenserum-Oxytocinase hat nach K. Semm (1) KCN keinen Einfluss.

6.) Zur Frage der Beeinflussung der Kuheuteroxytocinase durch Sojabohneninhibitor und Ovomuroid.

Versuchsvorgang:

Einige ml Kuheuterextrakt wurden mit den einzelnen Hemmstoffen 30 Min. lang bei 37° C vorinkubiert. Nach Zugabe von Oxytocin (0,136 IE/ml) und weiterer Inkubationszeit von 20 - 60 Min. erfolgte die Testung am suspendierten isolierten Rattenuterus. Die Versuchsergebnisse können aus nachstehender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 7

Hemmstoff Konz.	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in % ohne / mit Hemmstoff	
Sojabohneninhib.				
1,0 mg/ml	30	20	50	50
		60	70	70
0,1 mg/ml	30	20	50	50
		60	70	70
Ovomucoid				
1,0 mg/ml	30	20	50	50
		60	70	70
0,1 mg/ml	30	20	50	50
		60	70	70

Ergebnis:

Weder Sojabohneninhibitor noch Ovomuroid beeinflussen den Oxytocinabbau durch die Kuheuteroxytocinase.

7.) Aktivitäts - pH - Optimum der Kuheuteroxytocinase.

Kuheuterextrakt (1:1 homogenisiert mit Aqua dest.) wurde mit Phosphat-Pufferlösungen von pH 5 - pH 8 versetzt und nach genauer

Einstellung des betreffenden pH-Wertes im Abstand von 0,5 Einheiten eine Stunde lang bei dem entsprechenden pH-Wert belassen. Dann wurden die einzelnen Ansätze (mit verschiedenen pH-Werten) mit Oxytocin (0,136 IE/ml) versetzt (welches nur eine ganz minimale pH-Verschiebung herbeiführte, welche ausser acht gelassen wurde) und nach 60 Min. langer Inkubationszeit getestet.

Das Ergebnis veranschaulicht Abbildung IV.

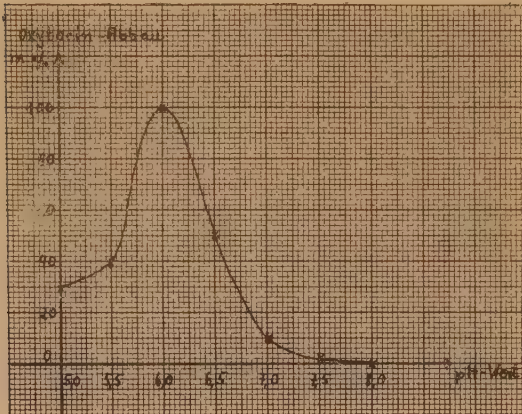


Abb. IV
pH-Optimum
der Kuheuter-
Oxytocinase

Ergebnis:

Das pH-Optimum der Kuheuteroxytocinase liegt bei pH 6 und fällt nach der stärker sauren und nach der alkalischen Seite hin stark ab. Bei pH 8 ist überhaupt keine Aktivität mehr nachzuweisen.

Das pH-Optimum der Schwangerenserum-Oxytocinase liegt zwischen pH 6,5 und 7,5 (6).

8.) Fraktionierung des Kuheuterextraktes mit Ammonsulfatlösung

Aus Kuheuterextrakt wurden mit Ammonsulfat halb- und ganzgesättigte Lösungen bereitet und abzentrifugiert. Anschliessend wurden sowohl die durch das Zentrifugieren erhaltenen Überstände als auch die Sedimente (die in Aqua dest. aufgeschwemmt wurden)

20 Stunden lang gegen fliessendes Wasser von 10° C dialysiert.

Sowohl bei der Halbsättigung als auch bei der Ganzsättigung war nach einstündiger Inkubationszeit bei der Testung am Rattenuterus weder im Dialysat des Überstandes noch des Sedimentes ein Oxytocinabbau nachzuweisen. Der Dialyseverlust an Oxytocinaseaktivität beträgt also 100%.

Da aber der Extrakt bei dieser Temperatur auch ohne Dialyse und ohne Ammonsulfatzusatz seine Aktivität verliert, ist dieser Befund nicht auf die Abtrennung eines dialysablen Co-Faktors zurückzuführen, sondern auf den Abbau des Fermentes durch eine begleitende Proteinase, die bei der Fällung der Oxytocinase durch Ammonsulfat mit in den Niederschlag geht. Es gelingt also nicht durch Ammonsulfat-Fällung das Ferment haltbarer zu machen.

Da der Rattenuterus gegenüber gesättigter Ammonsulfatlösung keine Beeinträchtigung der Kontraktionsfähigkeit zeigte und auch eine Ammonsulfat-Oxytocin-Standardlösung keinerlei Beeinflussung des Oxytocins ergab, wurde die Testung auch ohne vorherige Dialyse durchgeführt.

Die Testung des KEE-Oxytocin-Ammonsulfat-Ansatzes ergab nach einstündiger Inkubationszeit im Wasserbad von 37° C:

1.) Bei Halbsättigung mit Ammonsulfat:

75%-igen Abbau des Oxytocins durch das in
Aqua dest. aufgeschwemmte Sediment
(Globulinfraktion).

Jedoch keinen Abbau des Oxytocins durch den Über-
stand (Albuminfraktion).

2.) Bei Ganzsättigung mit Ammonsulfat:

80%-igen Abbau des Oxytocins durch das Sediment.
Keinen Oxytocinabbau durch den Überstand.

Durch die Ganzsättigung mit Ammonsulfat konnte nur eine ganz geringe Vermehrung der Oxytocinase-Aktivität des betreffenden Ansatzes erzielt werden, verglichen mit der Aktivität des Ansatzes der Halbsättigung. Die Oxytocinase der Milchdrüse dürfte also aller Wahrscheinlichkeit nach grösstenteils der Globulinfraktion angehören. Genauere elektrophoretische Untersuchungen hierüber wären noch angezeigt.

Über die Oxytocinase des Schwangerenserums ist bekannt:

Bei Halbsättigung des Schwangerenserums mit Ammonsulfat findet sich die Oxytocinase sowohl in der Albuminfraktion als auch in der Globulinfraktion (18). Diese ist jedoch bei etwas geringerer Sättigung als Halbsättigung frei von Oxytocinase (1 u. 4), so dass das Ferment nahe dem Bereich der Trennungslinie von Albuminen und Globulinen zu suchen ist.

Nach E. Werle und Mitarbeiter (16) erscheint bei der Elektrophorese die Schwangerenserumoxytocinase stets auf der kathodischen Seite des Albuminstromes, "angelehnt" an die α_1 -Globulinfraktion.

Die von H.E. Schultze und Biel hergestellten Eiweissfraktionen enthalten zitiert nach Semm (1) die Oxytocinase-Aktivität zu 20% in der Albumin- und zu etwa 80% in der α_1 -Globulinfraktion; das elektrophoretische Verhalten der Oxytocinase wird wahrscheinlich durch das angewandte Verfahren beeinflusst.

9.) Herstellung eines Trockenpulvers aus Kuheuterextrakt mit Aceton.

E. Werle und Mitarbeiter berichten (15), dass Extrakte aus Trockenpulver, welches mit Aceton und Äther hergestellt wurde (bei Zimmertemperatur), gegenüber Oxytocin inaktiv waren.

Um einen möglichst geringen Oxytocinaseverlust zu erzielen, wurde daher diesmal bei einer Temperatur von -15°C gearbeitet.

Durchführung der Versuche:

Der durch Aceton aus dem Kuheuterextrakt ausgefällte Niederschlag wurde mehrmals in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert und anschließend im Exsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet und dann fein pulverisiert.

20g Milchdrüsengewebe ergaben 0,5328 g Trockensubstanz.

Für eine vergleichbare Lösung mit dem Frischextrakt wurden also 0,0666 g dieses Trockenpulvers in 10 ml Aqua dest. aufgeschwemmt.

Die Testung am suspendierten isolierten Rattenuterus veranschaulicht Abbildung V.

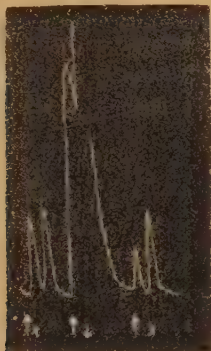


Abb. V
Oxytocinabbau durch Trockenpulverlösung (aus Milchdrüsen-
gewebe der Kuh).

Es wurden injiziert:

- bei 1) 0,2 ml Trockenpulverextrakt + 0,0272 IE Oxytocin
60 Min. bei 37° C inkubiert
Oxytocinabbau 95%
- bei 2) 0,2 ml Trockenpulverextrakt + 0,0272 IE Oxytocin
"Nullansatz"
- bei 3) wie bei 1)

Weitere Testungen sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8

Trockenpulverextrakt	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in %
1 Tag n. Herstellung	20	5
d. Trockenpulvers	40	5
	80	10
	110	30
1 Tag n. Herstellung + Cystein 1,0 mg/ml	20	30
2 Tage n. Herstellung	15	50
	30	90
	45	90
	60	90

	Min.	%
2 Tage n. Herstellung		
+ Cystein 1,0 mg/ml	25	100
- " - 2,0 mg/ml	25	100
1 Woche n. Herstellung	60	95
	120	95
3 Monate n. Herst.	60	90
3 1/2 Monate n. Herst.	60	90
5 Monate n. Herst.	90	5
	60	5
wässriger Extrakt		
24 Stunden bei		
- 15° aufbewahrt	45	0
	60	10
	90	50
	120	90

Ergebnis:

Trockenpulver aus Kuheuterdrüsengewebe bei - 15° mit Aceton hergestellt ist Oxytocinase aktiv.

100%-iger Oxytocinabbau wurde jedoch nur auf Zugabe von Cystein erreicht.

Eine Trockenpulverlösung besaß nach 24-stündiger Aufbewahrung bei - 10° bis - 15° noch etwa 50% der ursprünglich vorhandenen Aktivität.

Das Trockenpulver behielt 3 1/2 Monate lang seine volle Oxytocinase-Aktivität. Nach 5 Monaten war die Aktivität bis auf einen geringen Rest verloren gegangen.

II

1.) Versuche mit Extrakten aus der Milchdrüse eines weiblichen Kalbes.

Es war die Frage zu klären, ob Milchdrüsengewebe, das noch nicht laktiert hat, bereits die Fähigkeit besitzt Oxytocin zu inaktivieren.

Die Zusammensetzung der Extrakte war deshalb die gleiche wie beim Kuheuterextrakt. Es erübrigt sich daher näher auf die einzelnen Versuche einzugehen.

Eine kurze Erläuterung zu Abbildung VI möge das Ergebnis veranschaulichen.

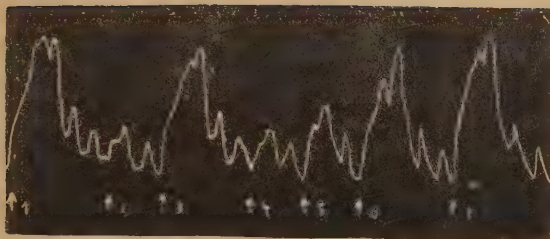


Abb. VI

Abbau von Oxytocin
durch den Extrakt
aus dem Euter eines
weiblichen Kalbes.

Zu dem isolierten Rattenuterushorn wurden in die Tyrodelösung injiziert:

- bei 1) 0,3 ml Standard-Oxytocinlösung = 0,0408 IE Oxytocin
- bei 2) 0,3 ml Euterextrakt + 0,0408 IE Oxytocin
30 Min. bei 37° C inkubiert
Oxytocinabbau 85%
- bei 3) 0,3 ml Euterextrakt + p-Cl-Mercuribenzoessäure/ 0,001 m.
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0408 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 0%
- bei 4) 0,3 ml Euterextrakt + Idranal/ 0,01 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0408 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 85%
- bei 5) 0,3 ml Euterextrakt + 8-Oxychinolin/ 0,001 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0408 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 50%
- bei 6) 0,3 ml Euterextrakt + Cystin/ 0,001 molar
15 Min. vorinkubiert, + 0,0408 IE Oxytocin,
30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 0%
- bei 7) wie bei 1)

Ergebnis:

Euterextrakt eines weiblichen Kalbes besitzt wie Kuheuterextrakt die Fähigkeit Oxytocin zu inaktivieren. Diese "Euteroxytocinase" zeigte in allen Untersuchungen das gleiche chemische und physikalische Verhalten wie die Kuheuteroxytocinase.

2.) Zur Frage der Oxytocinase-Aktivität von Rinderkolostrum.

E. Werle und Mitarbeiter (6) haben festgestellt, dass im Kolostrum Oxytocinase enthalten ist und auch Frauenmilch auf Zugabe von Cystein oder Glutathion die Fähigkeit besitzt Oxytocin zu inaktivieren, solange auch im Serum Oxytocinase vorhanden ist.

Versuche mit Rinderkolostrum:

2 ml unverdünntes Rinderkolostrum wurde mit 0,1 ml Oxytocin = 0,3 IE versetzt und längere Zeit im Wasserbad von 37° C belassen. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Reaktion durch Abkühlung auf 0° C unterbrochen und der bereits erfolgte Oxytocinabbau am Rattenuterus getestet.

Bei den wiederholt durchgeführten Versuchen wurde selbst bei langer Inkubationszeit (2 Stunden) nie mehr als 10 - 20% des zugefügten Oxytocins inaktiviert. Auf Zugabe von Cystein (1 mg/ml) war bereits nach 35 Min. 50%-iger Oxytocinabbau erreicht.

Ergebnis:

Rinderkolostrum besitzt demnach geringe Oxytocinase-Aktivität, die durch Cystein erheblich gesteigert werden kann (wohl aus einer im Kolostrum enthaltenen Vorstufe).

3.) Versuche mit Fettgewebe.

Fettgewebe wurde auf seine Fähigkeit hin geprüft, ob es Oxytocin abzubauen vermag.

Durchführung der Versuche:

Das Fettgewebe, das das Kuheuter reichlich umgibt, wurde im Verhältnis 1:4 mit Aqua dest. homogenisiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand für die Ansätze verwendet.

2 ml Fettextrakt wurden dann mit 0,1 ml Oxytocin (= 0,3 IE) versetzt und 60 Min. im Wasserbad von 37° C belassen.

Die Testung am Rattenuterus ergab, dass kein Oxytocinabbau eingetreten war.

In allen weiteren Versuchen wurde selbst bei langer Inkubationszeit (bis zu 3 Stunden) niemals ein Oxytocinabbau durch den Fettgewebe-Extrakt beobachtet. Auch auf Zugabe von Cystein (1 - 5 mg/ml Extrakt) trat kein Abbau ein.

Daraus kann man wohl schliessen, dass die Fähigkeit Oxytocin abzubauen dem Drüsengewebe des Kuheuters allein zugeschrieben werden muss und nicht eine Eigenschaft des im Drüsengewebe mehr oder weniger enthaltenen Fettgewebes ist.

Zur weiteren Klärung der Frage der Spezifität der Milchdrüsen-Oxytocinase wurden nun

4.) Versuche mit Ziegeneuterextrakt (ZEE)

durchgeführt.

Der Extrakt wurde genau so gewonnen wie eingangs beim Kuheuter beschrieben. Auch die Zusammensetzung der Ansätze und die zu prüfenden Hemmstoffe waren die gleichen, wie bei den Versuchen mit Kuheuterextrakt.



Abb. VII
Oxytocinabbau durch ZEE
allein und in Gegenwart
von 8-Oxychinolin und
Idranal

Zu Abbildung VII:

Zu dem suspendierten Rattenuterushorn wurden in die Tyrodelösung injiziert:

bei 1) 0,1 ml Standard-Oxytocinlösung = 0,0136 IE Oxytocin

bei 2) 0, 1ml ZEE + 0,0136 IE Oxytocin

15 Min. bei 37° C inkubiert

Oxytocinabbau 95%

- bei 3) 0,1 ml ZEE + 8-Oxychinolin/ 0,001 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0136 IE Oxytocin, weitere 15 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 30%
- bei 4) 0,1 ml ZEE + Idranal/ 0,01 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0136 IE Oxytocin, weitere 15 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 98%
- bei 5) wie bei 3), jedoch ohne Inkubationszeit = "Nullansatz"
- bei 6) wie bei 4), jedoch ohne Inkubationszeit = "Nullansatz"

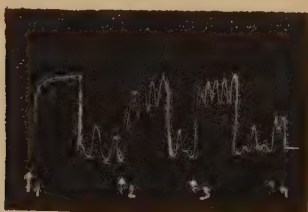


Abb. VIII

Oxytocinabbau durch ZEE
 allein und in Gegenwart
 von p-Cl-Mercuribenzoe-
 säure und Cystin.

Zu Abbildung VIII:

Es wurden injiziert:

- bei 1) 0,3 ml Standard-Oxytocinlösung = 0,0408 IE Oxytocin
- bei 2) 0,3 ml ZEE + p-Cl-MBS/ 0,001 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0408 IE Oxytocin, weitere 25 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 10%
- bei 3) 0,3 ml ZEE + Cystin/ 0,001 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0408 IE Oxytocin, weitere 25 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 10%
- bei 4) 0,3 ml ZEE (15 Min. vorinkubiert)
 + 0,0408 IE Oxytocin, weitere 25 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 95%

Weitere Versuche sind aus Tabelle 9 zu ersehen.

Tabelle 9

Hemmstoff Konz./molar	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub.Zt. in Min.	Abbau in % ohne / mit Hemmstoff	
<u>Idranal</u>				
0,01	30	70	100	100
0,001	15	15	95	98
<u>8-Oxychinolin</u>				
0,01	15	15	95	30
0,01	15	20	90	10
0,001	15	20	90	80
<u>p-Cl-MBS</u>				
0,001	15	25	95	10
0,001	60	45	95	50
0,001	20	20	75	5
0,001	0	20	75	5
0,0005	20	20	75	75
0,0001	30	70	100	100
<u>Cystin</u>				
0,001	60	45	95	50
0,001	50	25	95	10
0,0001	30	70	100	100

Ergebnis:

Ziegeneuterextrakt ist oxytocinaseaktiv. Die "Ziegeneuter-Oxytocinase" weist in allen Punkten das gleiche Verhalten wie die "Kuheuterootocinase" auf.

5.) Eiweissbestimmung des Kuh- und Ziegeneuter-
Extraktes nach der Biuret-Methode.

An Durchschnittswerten ergaben sich:

Im Kuheuterextrakt waren in 0,1 ml 1,7 mg N = 10,625 mg Eiweiss.

Im Ziegeneuterextrakt waren in 0,1 ml 2,5 mg N = 15,625 mg Eiw.

Durchschnittlich inaktivierte:

1 ml KEE 0,15 IE Oxytocin in 53 Minuten

1 ml ZEE 0,15 IE Oxytocin in 40 Minuten

Der höhere Eiweißgehalt des in den Versuchen verwendeten Ziegeneuters entspricht dem Ergebnis, dass durchschnittlich das Oxytocin von der gleichen Menge Ziegeneuterextrakt schneller abgebaut wurde als durch Kuheuterextrakt.

6.) Versuche mit synthetischen Oxytocin.

1953 wurde Oxytocin erstmals durch du Vigneaud und Mitarbeitern synthetisiert (18).

Inzwischen (1955) wurde von Boissonas und Mitarbeitern ein Verfahren ausgearbeitet, auf Grund dessen das Oxytocin auch fabrikmässig synthetisch hergestellt werden konnte (19).

Die Firma Messers. Sandoz brachte das synthetische Oxytocin unter dem Namen Syntocinon (OTS 68) in den Handel.

Dieses synthetische Präparat wurde u.a. in der Frauenklinik in St. Gallen (20) und in dem University College Obstetric Hospital London, klinisch erprobt (21). Das Syntocinon erwies sich als ein dem natürlichen Oxytocin gleichwertiges Wehenmittel.

Auch nach anderen Untersuchungen (19) ist die Uteruswirkung des Syntocinon sowohl in situ als auch in vitro gleich der des gereinigten natürlichen Oxytocins.

Während neben der antidiuretischen Wirksamkeit der Hypophysenhinterlappenhormone (beim Menschen), als deren Träger sich eindeutig Vasopressin erwies, auch eine diuretische Aktivität beim Hund und an Ratten beobachtet wurde, konnte nun durch Wasserdiaureseversuche an Ratten mit dem sicher vasopressinfreien Syntocinon festgestellt werden, dass wahrscheinlich auch das Oxytocinmolekül selbst eine geringe aber charakteristische antidiuretische Eigenschaft und - zumindest für Ratten - auch eine gewisse diuretische Wirkung besitzt (22).

Nach K. Semm (1) wird das synthetische Oxytocin von der Schwangerenserum-Oxytocinase in vitro ebenso abgebaut wie das natürliche Oxytocin, jedoch verläuft der Abbau ungefähr um 30% langsamer.

In unserem Falle interessierte nun, ob das synthetische Oxytocin auch vom Kuh- bzw. Ziegeneuterextrakt abgebaut wird.

Das verwendete Syntocinon (OTS 68) stammte von der Sandoz AG., Nürnberg und enthielt 10 IE/ml.

Die Versuche wurden nun genau so ausgeführt wie vorher bei Verwendung von Oxytocin beschrieben wurde. Als Parallelversuch wurde neben dem Ansatz mit Syntocinon auch ein Ansatz mit Oxytocin getestet. Die Versuche gibt Tabelle 10 wieder.

Tabelle 10

Extrakt	Inkubationszeit in Min.	Abbau in %	
		Oxytocin	Syntocinon
KEE	25	90	90
KEE	45	100	100
KEE	20	85	85
ZEE	40	100	100
ZEE	35	90	90

Ergebnis:

Syntocinon (OTS 68) wird durch Kuh- und Ziegeneuterextrakt ebenso abgebaut wie das natürliche Oxytocin.

Auch in zeitlicher Hinsicht war kein merklicher Unterschied im Abbau vorhanden.

Es wurden auch Hemmungsversuche mit Idranal, p-Cl-Mercuribenzoesäure, Cystin und 8-Oxychinolin durchgeführt. Diese zeigten durchwegs die gleichen Ergebnisse wie bei den Versuchen mit natürlichem Oxytocin, wurden daher nicht eigens angeführt.

III

Abgrenzung der Oxytocinase der Milchdrüse gegenüber anderen Geweboxytocinasen.

Da Oxytocin ein Polypeptid, allerdings cyclischer Natur, darstellt, war es nicht ausgeschlossen, dass auch Proteinasen anderer Gewebe das Hormon angreifen.

Es ist bereits bekannt, dass auch Plazenta-, Darm- und Pankreas-Extrakte Oxytocin abzubauen vermögen.

Es war zu untersuchen ob diese Fermente der Plazenta, des Darmes

und des Pankreas durch die Hemmstoffe für Schwangerenserum- oder Milchdrüsen-Oxytocinase in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

1.) Die Oxytocinase der Plazenta.

Die menschliche Plazenta enthält eine Reihe von Fermenten, wie Hydrolasen (zu denen als Peptidase die Oxytocinase zählt), Transferasen, Oxydoreduktasen, Lyasen und Synthesen, Isomerasen, Razemasen und Enzymkomplemente (23).

Da die menschliche Plazenta sowohl aus fetalem wie auch aus mütterlichem Gewebe besteht, also kindliches und mütterliches Blut enthält, ist die Untersuchung von Fermenten im Plazentagewebe besonders schwierig, denn die Plazenta muss zuerst vollständig entblutet werden.

Durchführung der Versuche:

Entblutetes Plazentagewebe wurde 1:1 homogenisiert und abzentrifugiert. Der so gewonnene Extrakt wurde für die "Ansätze" in der gleichen Zusammensetzung verwendet wie der Kuheuterextrakt.

Auch die Hemmungsversuche mit Idranal, p-Cl-Mercuribenzoessäure, Cystin und 8-Oxychinolin wurden wie beim Kuheuter beschrieben durchgeführt. Abbildung IX und Tabelle 11 mögen das Ergebnis veranschaulichen.



Abb. IX

Abbau von Oxytocin durch Plazenta-Extrakt allein und in Anwesenheit von p-Cl-Mercuribenzoessäure, 8-Oxychinolin, Idranal und Cystin.

Dem in 10 ml luftdurchperlter Tyrodelösung suspendierten isolierten Rattenuterushorn wurden appliziert:

- bei 1) 0,5 ml Plazenta-Extrakt + p-Cl-MBS/ 0,01 molar
15 Min. bei 37° C vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 25%
- bei 2) 0,5 ml Plazenta-Extrakt + 8-Oxychinolin/ 0,01 molar
15 Min. bei 37° C vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 10%
- bei 3) 0,5 ml Plazenta-Extrakt (15 Min. vorinkubiert)
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 95%
- bei 4) 0,5 ml Plazenta-Extrakt + Idranal/ 0,01 molar
15 Min. bei 37° C vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 95%
- bei 5) 0,5 ml Plazenta-Extrakt + Cystin/ 0,01 molar
15 Min. bei 37° C vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 95%
- bei 6) 0,5 ml Standard-Oxytocinlösung = 0,0680 IE Oxytocin

Weitere Versuche:

Tabelle 11

Hemmstoff Konz./molar	Vorinkub. Zt. in Min.	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in % ohne / mit Hemmst.	
<u>Idranal</u>				
0,01	15	30	90	75
0,01	15	60	100	100
0,01	15	30	90	85
<u>p-Cl-Mercuribenzoës.</u>				
0,01	15	30	90	10
0,01	15	30	90	30
<u>Cystin</u>				
0,01	15	30	90	90
0,01	15	30	90	90
<u>8-Oxychinolin</u>				
0,01	15	30	90	10
0,01	15	30	85	0

Ergebnis:

Der Oxytocinabbau durch Plazenta-Extrakt wird durch 8-Oxychinolin und p-Cl - Mercuribenzoessäure gehemmt. Eine geringe Hemmwirkung durch Idranal ist fraglich. Cystin beeinflusste den Oxytocinabbau nicht. Die verwendete Konzentration der Hemmstoffe war in allen Versuchen 0,01 molar.

Der wässrige Extrakt aus Plazentagewebe ist, bei -15°C aufbewahrt, mehrere Tage lang oxytocinaseaktiv. Nach 30 Tagen waren noch 50% der ursprünglichen Aktivität vorhanden.

2.) Die Oxytocinase des Darmes. (Dünndarm der Kuh)

Der Extrakt wurde genau so gewonnen wie der aus Kuheuter. Die Zusammensetzung der "Ansätze" und die verwendeten Hemmstoffe waren ebenfalls die gleichen.

Aus Abbildung X und Tabelle 12 ist das Ergebnis ersichtlich.

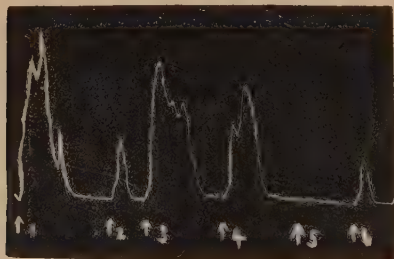


Abb. X

Abbau von Oxytocin durch Darmextrakt allein und in Gegenwart von p-Cl-Mercuribenzoessäure, Cystin, Idranal und 8-Oxychinolin.

Es wurden injiziert:

bei 1) 0,2 ml Oxytocin-Standardlösung = 0,0272 IE Oxytocin

bei 2) 0,2 ml Darmextrakt (15 Min. vorinkubiert)
+ 0,0272 IE Oxytocin, weitere 40 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 90%

bei 3) 0,2 ml Darmextrakt + p-Cl-MBS/ 0,001 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0272 IE Oxytocin, weitere 40 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 0%

- bei 4) 0,2 ml Darmextrakt + Cystin/ 0,001 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0272 IE Oxytocin, weitere 40 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 30%
- bei 5) 0,2 ml Darmextrakt + Idranal/ 0,01 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0272 IE Oxytocin, weitere 40 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 10%
- bei 6) 0,2 ml Darmextrakt + 8-Oxychinolin/ 0,01 molar
 15 Min. vorinkubiert
 + 0,0272 IE Oxytocin, weitere 40 Min. inkubiert
 Oxytocinabbau 90%

Tabelle 12

Hemmstoff Konz./molar	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub. Zt. in Min.	Abbau in % ohne/ mit Hemmstoff	
<u>Idranal</u>				
0,01	15	40	90	95
0,01	30	20	90	90
0,01	30	40	90	90
0,01	30	60	90	90
<u>8-Oxychinolin</u>				
0,01	15	40	90	90
0,01	30	20	90	90
		40	90	90
		60	90	90
0,001	15	50	80	80
<u>p-Cl-Mercuribenz.</u>				
0,01	15	50	80	40
0,01	15	50	100	50
0,001	15	40	90	0
0,001	30	20	90	0
		40	90	0
		60	90	0

molar	Minuten	Minuten	%	
<u>Cystin</u>				
0,01	15	40	90	10
0,001	15	50	80	40
0,001	15	50	100	50
0,001	30	20	90	0
		40	90	0
		60	90	0
<u>Ovomucoid</u>				
1 mg/ml	15	50	60	60
<u>Sojabohneninhib.</u>				
1 mg/ml	15	70	90	90

Ergebnis:

Die Oxytocinase des Dünndarms wird in ihrer Aktivität durch Cystin und p-Cl-Mercuribenzoessäure gehemmt. Idranal und 8-Oxychinolin, sowie auch Sojabohneninhibitor und Ovomucoid waren ohne Einfluss auf die Aktivität.

Der wässrige Extrakt besass nach 9 Tagen (bei -15° C aufbewahrt) noch 100%-ige Oxytocinase-Aktivität verglichen mit dem Frischansatz.

3.) Die Oxytocinase des Pankreas. (Kuh)

Der Extrakt wurde genau so wie für den Kuheuterextrakt beschrieben hergestellt, ebenso die "Ansätze".

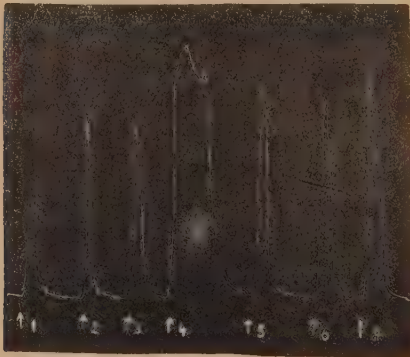


Abb. XI

Abbau von Oxytocin durch Pankreasextrakt allein und in Anwesenheit von p-Cl-Mercuribenzoessäure Cystin, Idranal und 8-Oxychinolin.

In die 10 ml luftdurchperlter Tyrodelösung von 37° C, in der das isolierte Rattenuterushorn suspendiert war, wurden injiziert:

- bei 1) 0,5 ml Pankreasextrakt (15 Min. bei 37° C vorinkubiert)
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 60 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 85%
- bei 2) 0,5 ml Pankreasextrakt + p-Cl-MBS/ 0,01 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 60 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 85%
- bei 3) 0,5 ml Pankreasextrakt + Cystin/ 0,01 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 60 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 85%
- bei 4) 0,5 ml Oxytocin-Standardlösung = 0,0680 IE Oxytocin
- bei 5) 0,5 ml Pankreasextrakt (15 Min. vorinkubiert)
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 78%
- bei 6) 0,5 ml Pankreasextrakt + Idranal/ 0,01 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 78%
- bei 7) 0,5 ml Pankreasextrakt + 8-Oxychinolin/ 0,01 molar
15 Min. vorinkubiert
+ 0,0680 IE Oxytocin, weitere 30 Min. inkubiert
Oxytocinabbau 78%

Ergebnis der Versuche nach Abbildung XI und Tabelle 13.

Pankreasextrakt inaktiviert Oxytocin, doch konnte selbst bei längerer Inkubationsdauer nie ein 100%-iger Abbau des Oxytocins erreicht werden.

Keines der Stoffe (Idranal, 8-Oxychinolin, p-Cl-Mercuribenzoessäure, Cystin, Sojabohneninhibitor und Ovomucoid) verursachten in der verwendeten Konzentration (0,01 molar) eine eindeutige Hemmung der Oxytocinase.

Pankreasextrakt besass bei -15° C aufbewahrt nach 24 Stunden noch 100%-ige Aktivität verglichen mit dem Frischextrakt. Nach 48 und 72 Std. waren nur etwa 10 bzw. 20% Aktivität verloren gegangen.

Tabelle 13

Hemmstoff Konz./molar	Vorinkub.Zt. in Min.	Inkub.Zt. in Min.	Abbau in %	
			ohne	/mit Hemmst.
<u>Idranal</u>				
0,01	15	30	80	80
0,01	15	30	65	65
		60	75	75
0,01	30	30	80	80
		75	90	90
<u>8-Oxychinolin</u>				
0,01	0	45	75	75
0,01	15	30	80	80
0,01	15	30	65	65
		60	75	75
0,01	30	30	70	65
		75	80	85
0,001	15	30	65	65
		60	75	75
<u>p-Cl-Mercuribenzoës.</u>				
0,01	15	30	80	80
		60	90	90
0,001	50	30	80	80
		50	90	90
		70	90	90
<u>Cystin</u>				
0,01	15	60	90	90
0,001	50	50	80	50
		70	90	85
<u>Sojabohneninhib.</u>				
1 mg/ml	30	30	80	80
<u>Ovomucoid</u>				
1 mg/ml	30	30	80	80

Zusammenfassung und Diskussion

1. Das Hypophysenhinterlappen-Hormon Oxytocin wird durch Extrakte aus der Milchdrüse (Kuh, Ziege,) dem Dünndarm und Pankreas (Kuh) und der Plazenta (Mensch), sowie durch Schwangerenserum abgebaut.

Hierbei wurden 0,15 IE Oxytocin durch 1 ml Extrakt aus:

Ziegeneuter	in durchschnittlich	40 Min.	inaktiviert
Dünndarm	- " -	52 Min.	- " -
Kuheuter	- " -	53 Min.	- " -
(Trockenpulver)	- " -	(53 Min.	- " -
Pankreas	- " -	54 Min.	- " -
Plazenta	- " -	40 Min.	- " -
(1:1 homogen!)			
Schwangerenserum	- " -	87 Min.	- " -

Am schnellsten inaktivierte also ein Extrakt aus Ziegeneuter.

Rinderkolostrum besitzt nur in ganz geringem Masse die Fähigkeit Oxytocin zu inaktivieren. Die Oxytocinase-Aktivität des Kolostrums wird jedoch durch Zugabe von Cystein 1 mg/ml erheblich gesteigert, wobei zu beachten ist, dass Cystein allein das Oxytocin nicht zu inaktivieren vermag.

Extrakte aus dem Fettgewebe des Euters greifen Oxytocin nicht an.

2. Synthetisches Oxytocin (OTS 68) erwies sich in Bezug auf seine Angreifbarkeit durch Fermente in allen Versuchen dem natürlichen Oxytocin völlig gleichwertig.

Wie der Abbau des Oxytocins (bzw. Syntocinons) durch die Fermente vor sich geht, ist noch nicht restlos geklärt. Nach neuesten Untersuchungen (24) wird die Auffassung vertreten, dass Oxytocin seine Aktivität verliert, wenn die Schwefelbrücke zu SH- reduziert wird und sie wieder durch Oxydation gewinnt. Es spricht aber nichts dafür, dass die Inaktivierung durch unser Ferment auch durch Spaltung der Schwefelbrücke zustande kommt.

3. Die Oxytocinase der Milchdrüse der Kuh wird durch Halbsättigung der Extrakte mit Ammonsulfat niedergeschlagen, gehört also wahrscheinlich zu den Globulinen.

4. Das Aktivitätsoptimum der Oxytocinase des Kuheuters liegt bei pH 6. Die Aktivitätskurve fällt nach der stärker sauren und nach der alkalischen Seite hin steil ab.
5. Trockenpulver aus Kuheuterextrakt, hergestellt mit Aceton bei -15°C ist oxytocinaseaktiv.
Diese Aktivität bleibt bei $3\frac{1}{2}$ monatelanger Aufbewahrung des Trockenpulvers bei -10° bis -15°C unverändert erhalten.
6. Der Metallkomplexbildner Aethylendiamintetraacetat (Trilon B bzw. Idranal) beeinflusste in einer Molarität von 0,001 bis 0,01 die Oxytocinase des Kuh- und Ziegeneuters, des Dünndarms und des Pankreas nicht. Gegenüber der Oxytocinase des Plazenta-Extraktes konnte keine sichere Hemmwirkung beobachtet werden.
Danach kann geschlossen werden, dass keine Metalle zur Fermentaktivität als Co-Faktoren notwendig sind. Es könnte allerdings möglich sein, dass der Ferment-Metall-Komplex sehr viel stabiler ist als der Komplex mit dem Chelatbildner, der hauptsächlich Schwermetalle inaktiviert; dann müssten höhere Konzentrationen von Trilon B z.B. 0,1 molar zur Inaktivierung führen, was noch nicht untersucht wurde.
Einen Hinweis, dass Metalle wie Zn und Al doch eine Rolle spielen, geben die Untersuchungen mit 8-Oxychinolin.
Hier ergab sich mit einer 0,003 molaren Oxychinolin-Konzentration im Versuchsansatz eine 50%-ige Hemmung der Euter-Oxytocinase. Eine Molarität von 0,01 führte zu einer völligen Inaktivierung des Fermentes im Kuh- und Ziegeneuter- und Plazenta-Extrakt.
Die Oxytocinase-Aktivität des Dünndarm- und Plazenta-Extraktes wurden durch 8-Oxychinolin (0,001 bis 0,01 molar) nicht beeinflusst.
7. p-Chlormercuribenzoessäure wirkte hemmend auf die Oxytocinase des Kuh- und Ziegeneuterextraktes, des Dünndarm- und Plazenta-Extraktes, sowie auf die Oxytocinase des Schwangerenserums.
Das oxytocinabbauende Prinzip des Pankreasextraktes wurde durch die p-Chlormercuribenzoessäure nicht beeinflusst.
Eine p-Chlormercuribenzoessäure-Konzentration von 0,0002 molar bewirkte 50%-ige Hemmung der Euteroxytocinase, eine Molarität

von 0,001 im Euter-, Dünndarm- und Plazenta-Extrakt eine 100%-ige Hemmung der Oxytocinase.

Dieses Versuchsergebnis ist ein Beweis dafür, dass die Oxytocinase ein SH-Gruppen Enzym ist.

Die Blockierung der SH-Gruppen durch das Hg-Präparat führt zum Verlust der Ferment-Aktivität.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass SH-Gruppen eine Rolle spielen besteht darin, dass das Ferment durch Cystein und SH-Glutathion in seiner Aktivität erheblich gesteigert zu werden vermag, bzw. inaktives Ferment in aktives Ferment übergeführt werden kann - wohl durch die Reduktion von S-S Brücken zu SH-Gruppen.

8. Cystin ergab in den Versuchen mit Euter- und Dünndarmextrakt in einer Molarität von 0,001 eine etwa 80%-ige Hemmung der Oxytocinase. 100%-ige Hemmung konnte auch mit einer Cystin-Molarität von 0,01 nicht erreicht werden.

Das Cystin dürfte als S-S Verbindung wie das Oxytocin Affinität zum Ferment besitzen, ohne von diesem gespalten zu werden und so das Ferment für den Oxytocinabbau blockieren.

Die Aktivität der Oxytocinase des Pankreas, der Plazenta und des Schwangerenserums wurde durch Cystin (0,001 bis 0,01 molar) nicht beeinflusst.

9. Die Trypsininaktivatoren Ovomucoid und Sojabohneninhibitor wirkten in einer Konzentration von 0,1 bis 1,0 mg/ml auf keine der oben angeführten Gewebsoxytocinasen hemmend. Das oxytocinabbauende Ferment ist also gegen Trypsin abgrenzbar.

10. KCN ist ebenfalls in einer Konzentration von 0,001 bis 0,02 m ohne Einfluss auf die Oxytocinase.

Eine prosthetische Gruppe mit einer Carbonylgruppe ist somit ausgeschlossen.

Dieser Befund stimmt mit den Untersuchungsergebnissen mit Äthylendiamintetraacetat überein, da Eisen durch KCN inaktiviert würde.

11. Die Oxytocinase des Kuheuters stimmt in ihrem chemischen und physikalischen Verhalten nur mit dem oxytocinabbauenden Prinzip des Ziegeneters und des Euters des weiblichen Kalbes überein.

12. Die Milchdrüsen-Oxytocinase unterscheidet sich von der Schwangerenserum-Oxytocinase und von den anderen angeführten Gewebs-Oxytocinasen durch ihre ausgeprägte Thermolabilität und ihr verschiedenes Verhalten gegenüber den verwendeten Hemmstoffen.

Eine Identität der Euteroxytocinase mit der Schwangerenserum¹-Oxytocinase sowie den oxytocinabbauenden Prinzipien der Plazenta, des Darmes und des Pankreas kann auf Grund der Untersuchungen wohl verneint werden.

13. Ein annähernd übereinstimmendes Verhalten in vitro zeigen nur Plazenta-Extrakt und Schwangerenserum.
14. Die Gewebsoxytocinasen des Darmes und des Pankreas verhalten sich gegenüber den verwendeten Agentien ebenfalls verschieden, so dass auch hier eine Identität nicht vorliegen dürfte.

LITERATURVERZEICHNIS

Zitat-Nr.

- ACHER R. Sur les Relations entre l'Oxytocine et la (13)
 Manoussos G. Vasopressine d'une part et la Protéine de
 Olivry G. van Dyke autre part.
 Biochem.et biophys.acta 16 155 (1955)
- ACHER R. Sur l'Existence Eventuelle d'une Hormone (14)
 Chauvet J. Unique Neurophysaire.
 Biochem.et biophys.acta 22 I 421 - 427
 (1956) II 428 - 432
- ANDRAIN L. Relation entre l'activité physiologique (24)
 Clauser H. de l'oxytocine et l'état de son pon
 disulfure.
 Biochem.et Biophys.Acta 30 192 (1958)
- BAINBRIDGE M.N. Synthetic Oxytocin (21)
 Nixon W.C.W. Syt.5 Brit. Med.J. 1956 I 1133
 Schild H.O.
 Smyth S.N.
- BEHRENS O.K. Biochemistry of the Protein-Hormones (12)
 Bromer W.W. Annual Reviev Biochem. 27 71 - 72, (1958)
- BERDE E. Über die antidiuretische und diuretische (22)
 Cerletti A. Wirkung von synthetischem Oxytocin im
 Wasserdiureseversuch an Ratten.
 Helv.Physiol.et Pharmacol.Acta
14 129 - 134 (1956)
- BILEK J. Studium des Einflusses von Oxytocin auf (10)
 Janovsky M. den Milchausscheidungsreflex.
 Sbornik ceskoslov.akad.zemedelskych ved,
 zivocisna vyroba 29 773 (1956)
 (zitiert nach H.Hrúschka 4560)
- BONSON G.K. The Effekt of Oxytocin on Mammary Gland (11)
 Folley S.J. Involution in the Rat.
 The Journal of Endocrin. 16 189 (1957)
- BÖSEL K. Die Anwendung von Oxytocin in der Geburts- (20)
 Käser O. leitung.
 Schw.Med.Wschr. 86 Nr.9 229 (1956)
- DU VIGNEAUD The Synthesis of an Octapeptide Amide with (18)
 Ressler Ch. the Hormonal Activity of Oxytocin.
 J.Amer.Chem.Soc. 75 4879 (1953)
- KONZETT H. Syntocinon, ein synthetisches uteruswirk- (19)
 Berde B. sames Hypophysenhinterlappenhormon.
 Cerletti A. Schw.Med.Wschr. 86 Nr.9 226 - 229, 1956

- KYONK H. Die Fermente der normalen und Toxikose-plazenta. (23)
Gynaecologia 145 145 - 159 (1958)
- MARTIUS H. Lehrbuch der Geburtshilfe I, Physiologie (2)
302 - 303, 1948
- MAYR R. Über den Abbau des Oxytocins im Schwan- (8)
gerenblut. Dissert. 1949
- SEMM K. Der Oxytocin-Oxytocinase-Haushalt unter (1)
besonderer Berücksichtigung des Wehen-
problems. Habilit. Schrift 1958
- SEMM K. Aktivitätsbestimmung der Serumoxytocinase (4)
als Schwangerschaftsreaktion.
Dissert. 1951
- TUPPY H. Über die Amino-peptidase-Aktivität des (17)
Nesvadba H. Schwangerenserums und ihre Beziehung zu
dessen Vermögen Oxytocin zu inaktivieren.
M.H.f.Chem. 88 977 - 988 (1957)
- WERLE E. Über die oxytocinabbauende Fähigkeit des (3)
Efkemann G. Schwangerenblutes.
Arch.f.Gynäk. 171 286 - 290 (1941)
- WERLE E. Methode zur Schwangerschaftsdiagnose mit (5)
Semm K. Bestimmung des Alters der Frucht.
Arch.f.Gynäk. 187 106 - 111 (1955)
- WERLE E. Zur Kenntnis des oxytocinabbauenden (6)
Hevelke A. Prinzips des Blutes.
Buthmann K. Biochem. Zeitschr. 309 270 (1941)
- WERLE E. Über die Oxytocinase des Schwangeren- (7)
Semm K. blutes und der Erythrocyten.
Enzenbach R. Arch.f.Gynäk. 177 211 - 217 (1950)
- WERLE E. Über den Abbau von Oxytocin und Vaso- (15)
Maier L. pressin durch Milchdrüsenextrakt der Kuh.
Die Naturw. 16 380 (1954)
- WERLE E. Über die Oxytocinase des Schwangeren- (16)
Semm K. blutes.
Arch.f.Gynäk. 187 449 - 457 (1956)
- WINKHAUS B. Oxytocinasebestimmungen bei Kühen unter (9)
Berücksichtigung der Bedeutung des Hor-
mones Oxytocin bei der Milchentleerung
und Geburtsauslösung. Dissert. 1954

L e b e n s l a u f

Am 29. März 1933 wurde ich als Tochter des Herrn Johann Bär, - Direktor auf dem Fürst zu Schwarzenberg'schen Grossgrundbesitz - und seiner Ehefrau Paula, geb. Pata in Krummau/Moldau (Böhmerwald) geboren.

Von 1939 - 1941 besuchte ich die Volksschule in Krummau, von 1941 - 1945 die Volksschule und anschliessend die 1. und 2. Klasse der Oberschule in Budweis.

Nach der Vertreibung aus der Heimat vollendete ich die Oberschule in Donauwörth und legte dort 1953 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1953/54 begann ich das Medizin-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. wo ich nach 11 Studiensemestern auch das Staatsexamen ablegte.

